

文章编号: 1005-6947(2013)02-0159-06

· 基础研究 ·

WTX 慢病毒载体及其稳转结肠癌细胞株 Lovo/WTX-EGFP 的建立

李思齐^{1,2}, 张毅², 何绍烜², 林丰², 向东², 陈嘉勇²

(1. 昆明医科大学, 云南昆明 650500; 2. 昆明医科大学第二附属医院急诊科, 云南昆明 650101)

摘要

目的: 构建抑癌基因 WTX 慢病毒载体, 建立稳定转导 WTX 的结肠癌 Lovo/WTX-EGFP 细胞株, 为研究 WTX 在结肠癌中的作用机制提供有效工具。

方法: 通过 Gateway 技术构建 WTX 慢病毒载体 pLV.Ex3d.null-EF1A>WTX>IRES/EGFP 并通过菌落 PCR 筛选鉴定, 将其与辅助质粒 pLV/helper-SL3, PLV/helper-SL4, PLV/helper-SL5 共转染 293FT 细胞包装慢病毒并在荧光显微镜下行滴度值测定。用 WTX 慢病毒载体转导结肠癌 Lovo 细胞株, 并通过多次挑克隆培养建立稳定表达 WTX 的 Lovo/WTX-EGFP 细胞株。

结果: Gateway 技术构建的慢病毒载体 pLV.Ex3d.null-EF1A>WTX>IRES/EGFP 经鉴定完全正确; 慢病毒包装 48 h 后视野下可见清晰绿色荧光表达, 病毒滴度为 5×10^7 TU/mL。慢病毒载体成功转导 Lovo 细胞, 经 qPCR 及 Western blot 检测 WTX 表达水平明显升高; 通过多次挑克隆培养成功建立了稳定转导 WTX 的 Lovo/WTX-EGFP 细胞株。

结论: 通过 Gateway 技术可成功构建 WTX 慢病毒载体并获稳定转导 WTX 的 Lovo/WTX-EGFP 细胞株, 为研究 WTX 在结肠癌中的作用机制提供了实验基础。

关键词

结肠肿瘤; 基因, 肿瘤抑制; WTX; 慢病毒载体

中图分类号: R735.3 文献标志码: A



DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.02.007

<http://www.zpwz.net/Jweb-zgptwk/CN/abstract/abstract3387.shtml>

Establishment of WTX-containing lentiviral vector and its stably transduced colon cancer cell line Lovo/WTX-EGFP

LI Siqui^{1,2}, ZHANG Yi², HE Shaoxuan², LIN Feng², XIANG Dong², CHEN Jiayong²

(1. Kunming Medical University, Kunming 650500, China; 2. Department of Emergency Medicine, the Second Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650101, China)

Corresponding author: CHEN Jiayong, Email: littlemark800306@yahoo.com.cn

ABSTRACT

Objective: To construct the lentiviral vector containing tumor suppressor gene WTX (Wilms tumor gene on the X chromosome) and the colon cancer cell line stably transduced with this WTX-containing vector (Lovo/

基金项目: 云南省科技厅 - 昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2010CD165); 云南省应用基础研究重点资助项目 (2011FA029)。

收稿日期: 2012-10-21; **修订日期:** 2012-12-28。

作者简介: 李思齐, 昆明医科大学博士研究生, 主要从事胃肠道肿瘤方面的研究。

通信作者: 陈嘉勇, Email: littlemark800306@yahoo.com.cn

WTX-EGFP), so as to provide a useful tool for studying the role of WTX in colon cancer.

Methods: The lentiviral vector pLV.Ex3d.null-EF1A>WTX>IRES/EGFP was constructed by Gateway technology, which was screened and identified by colony PCR. After that, it was co-transfected into the 293FT cells with three helper plasmids that were PLV/helper-SL3, PLV/helper-SL4 and PLV/helper-SL5 to package lentivirus and then the viral titer was determined under fluorescence microscope. Finally, the human colon cancer Lovo cells were transduced with the WTX-containing lentiviral vector to obtain the Lovo/WTX-EGFP cell line with stable expression of WTX gene through several subcultures by repeated colony picking.

Results: The lentiviral vector pLV.Ex3d.null-EF1A>WTX>IRES/EGFP constructed by Gateway technology was completely and correctly identified. The distinct green fluorescence was seen under fluorescence microscope 48 h after virus packaging and the virus titer was 5×10^7 TU/mL. The vector was successfully transduced into Lovo cells as evidenced by the significantly increased WTX expression level determined by both qPCR and Western blot was obviously higher than cells without transducing. The Lovo/WTX-EGFP colon cancer cell line with stable transduction of WTX containing vector was established by repeated colony picking and subcultures.

Conclusion: Through Gateway technology, the WTX-containing lentiviral vector can be successfully constructed and colon cancer Lovo/WTX-EGFP cell line can be stably transduced by this WTX-containing lentiviral vector. It may provide an experimental basis for studying the role of WTX in colon cancer.

KEY WORDS Colonic Neoplasms; Genes, Tumor Suppressor; WTX; Lentiviral Vector

CLC number: R735.3 **Document code:** A

DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.02.007

结肠癌的发展进程与癌基因激活及抑癌基因失活密切相关。2007 年在对 Wilms 瘤的研究中报道了一种新的位于 X 染色体的抑癌基因 WTX (Wilms tumor gene on the X chromosome), 该基因能负向调节 Wnt- β -catenin 通路^[1]。本课题组的前期研究^[2]表明, WTX 在结肠癌及癌旁组织中表达降低, 可能在结肠癌的发生发展中起到了一定作用。本研究通过构建抑癌基因 WTX 慢病毒载体, 建立稳定转导 WTX 的结肠癌细胞株 Lovo/WTX-EGFP, 为进一步研究 WTX 在结肠癌中的作用机制提供支持。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂

人结肠癌 Lovo 细胞 (中国科学院上海细胞库), 人胚肾 293FT 细胞 (美国 Invitrogen 公司), 质粒小提取试剂盒 (大连 Takara 公司), lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司), DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司), 胎牛血清 (美国 Gibco 公司), Opti MEM[®]I 转染混合液 (美国 Invitrogen 公司), Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), Purelink RNA 微试剂盒 (美国 Invitrogen 公司), Purelink genomic DNA 试

剂盒 (美国 Invitrogen 公司)、Superscript III cDNA 合成试剂盒 (美国 Invitrogen 公司)、Golden Taq PCR 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司)、Platinum[®] SYBR Green qPCR 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司), RIPA 细胞溶解缓冲液 (中国索来宝公司), 二辛可酸 (BCA) 蛋白检测试剂 (中国天根生化), 化学发光检测试剂 WP20005 (美国 Invitrogen 公司), 山羊抗人 WTX 多克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司) 及辣根过氧化物酶标记的驴抗羊抗体 (美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 引物设计

根据基因数据库 (GeneBank) 提供的人 WTX (FAM123B) mRNA 全长序列, 基因全长 8 443 bp (ACCESSION: NM_152424, GI: 124244055)。通过 Premier 5.0 软件设计 2 条 WTX 引物及 2 条内参 GAPDH 引物, 引物序列: WTX 正向为 GAC AAT AAC CGG GCT AGG AAC, WTX 反向为 CTG CTG TTT GTT CAC GGG TAC T; GAPDH 正向为 GGT CTC CTC TGA CTT CAA CA, GAPDH 反向为 GAG GGT CTC TCT CTT CCT。

1.3 慢病毒载体的构建及鉴定

通过 Invitrogen 公司的 Gateway 技术构建包含有绿色荧光蛋白基因 (EGFP) 的 WTX 慢病毒

载体 pLV.Ex3d.null-EF1A>WTX>IRES/EGFP, 并通过菌落多聚酶链反应 (PCR) 筛选鉴定 (委托广州赛业生物科技有限公司完成)。

1.4 慢病毒包装

取细胞状态良好, 处于对数生长期的 293FT 细胞, 细胞计数后, 按照每个 10 cm 的培养皿 5×10^6 个细胞数接种于培养皿中, 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 的培养箱中培养过夜。次日转染前去除旧的培养液, 加入 5 mL 新鲜的含 10% 血清 DMEM 培养液。制备 DNA-lipofectamine 2000 复合物: 在 1 支无菌的 5 mL 的离心管中先加入 1.5 mL 无血清 Opti-MEM[®]I 培养液, 再加入 pLV/helper-SL3, pLV/helper-SL4, pLV/helper-SL5 和目的质粒 (各 4 μg), 轻轻颠倒混匀。在另外 1 支无菌的 5 mL 离心管中加入 1.5 mL 无血清 Opti-MEM[®]I 培养液和 40 μL 的 lipofectamine 2000, 轻轻颠倒混匀。室温孵育 5 min 后将已稀释的 DNA 加于含有 lipofectamine 2000 的无血清 Opti-MEM[®]I 培养液中, 轻轻颠倒混匀。室温孵育 20 min。将 DNA-lipofectamine 2000 复合物添加到 293FT 细胞中, 前后轻轻摇晃培养皿以混匀复合物。放置 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 饱和湿度培养箱中过夜培养。转染后 1 d, 更换 10 mL 含 10% 血清 DMEM 培养液。放置培养箱中继续培养; 转染后 48 h 收集培养上清液进行浓缩; 加入 10 mL 新鲜的培养液继续培养, 转染后 72 h 再次收集浓缩, 分装好的病毒放置 -80°C 保存。

1.5 慢病毒滴度测定

转导前 1 d, 胰酶消化细胞并计数细胞密度, 按照合适的细胞密度接种于 6 孔板中, 放置 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 饱和湿度培养箱过夜培养。转导当天 (第 2 天), 融解病毒, 准备 10 倍稀释系列样品, 稀释倍数从 10^{-3} ~ 10^{-7} 。对于每一个稀释样品, 用完全培养液稀释病毒至总体积 1 mL。在含有病毒的培养液中加入聚凝胺, 轻轻吹打充分混匀。去除细胞中的培养液, 加入已含有不同病毒量的完全培养液。另保留一孔不添加病毒的细胞, 作为空白对照组, 每孔加入的培养液的体积为 1 mL, 培养箱过夜培养。转染后 1 d, 去除含有病毒的培养液, 加入 2 mL 新鲜的完全培养液, 培养箱过夜培养。计数荧光细胞数目, 并计算病毒滴度。

1.6 细胞转导

Lovo 细胞培养传代, 细胞计数后取 1×10^5 细胞 / 孔的密度接种于 6 孔板, 分为 3 组: Lovo/WTX-EGFP 组, 空载体 (Lovo/EGFP) 组, 空白细胞组。待细胞完全贴壁后进行转导。转导 48 h

后, 荧光显微镜下观察转导效果。待细胞长满后, 将 Lovo/WTX-EGFP 传代并采用低密度培养准备挑克隆纯化, 另将 Lovo/EGFP 传代进行扩增。

1.7 RT-PCR 及全时定量 PCR (qPCR) 检测

各组细胞以 Trizol 法提取总 RNA (按说明书操作), 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 RNA 的完整性, 逆转录反应合成 WTX cDNA, 逆转录-多聚酶链反应 (RT-PCR) 扩增 WTX 和 GAPDH (引物见 1.2 引物设计)。扩增条件: 变性 95°C 2 min; 95°C 15 s, 60.5°C 10 s, 70°C 45 s, 3 个循环; 最后 70°C 2 min。PCR 扩增后 2% 琼脂糖凝胶电泳, 荧光定量 PCR 仪 7000 (美国 ABI 公司) 行 qPCR 检测, 引物设计同上述。扩增条件: 变性 95°C 2 min; 95°C 15 s, 60.5°C 30 s, 3 个循环; 溶解曲线阶段 95°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s。以空白细胞组为校准样本, 应用 qPCR 法分析各组细胞 WTX 基因表达量的差异。结果以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析。 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值代表待测样本基因表达量相对于校准样本基因表达量的倍数。

1.8 Western blot 检测

蛋白裂解缓冲液 (RIPA) 提取细胞总蛋白, 二辛可酸 (BCA) 蛋白检测试剂进行蛋白定量 (按说明书操作)。经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、转膜, TBST 缓冲液洗涤并在室温中用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 4°C 过夜后加入一抗山羊抗人 WTX 多克隆抗体, 进行 2 次 10 min TBST 洗涤及 1 次 10 min TBS 洗涤后, 在膜中加入稀释的二抗辣根过氧化物酶标记的驴抗羊室温放置 1 h 然后同上法洗涤。化学发光检测试剂 WP20005 进行 Western blot 检测。内参照 β -肌动蛋白 (β -actin)。光密度分析软件 (Quantity One Software) 分析 WTX 蛋白条带的表达。

1.9 稳转结肠癌细胞株 Lovo/WTX-EGFP 的建立

将 Lovo/WTX-EGFP 以 200~500 个细胞接种于 10 cm 的培养皿中培养, 待细胞形成较大克隆且未连成片时, 在荧光显微镜下观察并标记荧光较纯的克隆, 在超净台中用枪头挑取克隆, 将克隆吹散接种进行培养扩增; 待克隆细胞长成后, 荧光显微镜下观察细胞的荧光率。若细胞的荧光率达到 80% 以上, 则将细胞继续传代扩增, 若达不到 80% 则将细胞低密度培养重新尝试挑克隆纯化直至细胞满足要求再进行传代扩增。

2 结果

2.1 成功构建和鉴定了 WTX 慢病毒载体

Gateway 技术构建的慢病毒载体 pLV.Ex3d.

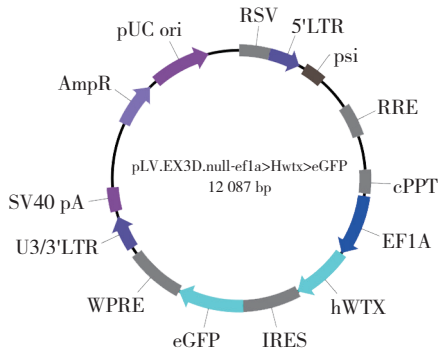


图 1 载体结构图谱

Figure 1 Structure of the recombinant lentiviral vector

2.2 慢病毒包装镜下所见及滴度

慢病毒包装 48 h 后镜下可见明显荧光 (图 3)。

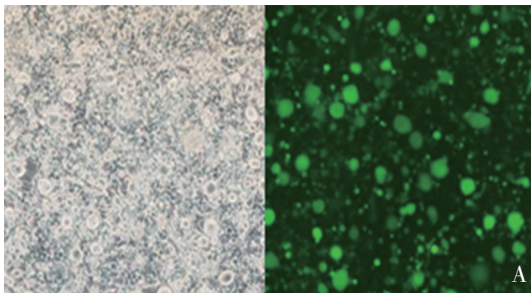


图 3 慢病毒载体包装后镜下观察 (×100)

Figure 3 Microscopic observation after lentivirus package (×100)

null-EF1A>WTX>IRES/EGFP 经菌落 PCR 筛选及测序完全正确, PCR 产物条带理论大小为 3 461 bp, 与目的条带大小相符的克隆即为阳性克隆。载体结构图谱及菌落 PCR 筛选结果见图 1-2。

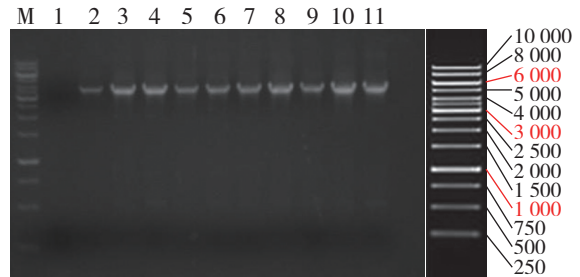
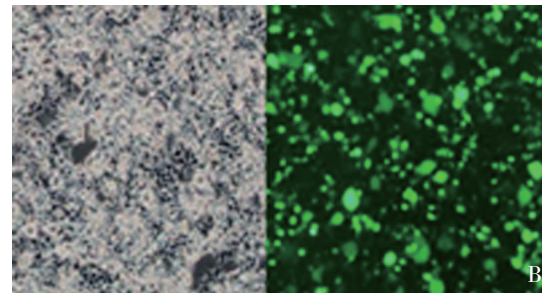


图 2 菌落 PCR 筛选结果 M: 分子质量标记; 1: 空白对照; 2-11: pLV.Ex3d.null-EF1A>WTX>IRES/EGFP 1-10 号克隆

Figure 2 Screen results by colony PCR M: Molecular weight marker; 1: Blank control; 2-11: No. 1 to 10 clones of pLV.Ex3d.null-EF1A>WTX>IRES/EGFP

病毒滴度测定 WTX 慢病毒载体组为 5×10^7 TU/mL, EGFP 空载体对照组为 5.5×10^7 TU/mL。



A: WTX 慢病毒载体组; B: EGFP 空载体组

A: WTX-containing lentiviral vector; B: EGFP empty vector

2.3 细胞转导镜下所见

转导 48 h 后荧光显微镜下观察可见明显荧光

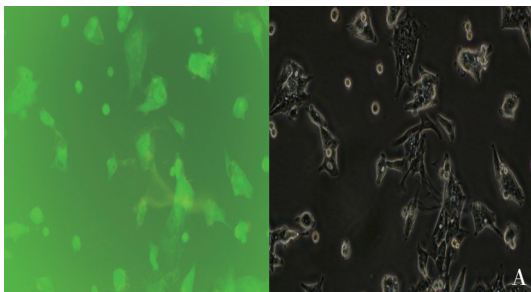
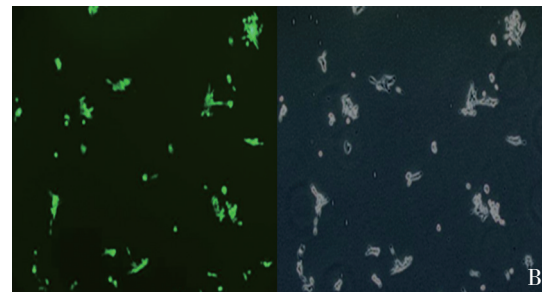


图 4 Lovo 细胞转导后镜下观察 (×100)

Figure 4 Microscopic observation of Lovo cells after transduction (×100)

(×100) (图 4)。Lovo/WTX-EGFP 组转导效率约 50%, 空载体 (Lovo/EGFP) 组转导效率约 80%。



A: Lovo/WTX-EGFP 组; B: 空载体 (Lovo/EGFP) 组

A: Lovo/WTX-EGFP transduction, B: Empty vector (Lovo/EGFP) transduction

2.4 转导细胞 WTX mRNA 的表达水平

qPCR 结果显示 Lovo/WTX-EGFP 细胞 WTX mRNA

表达水平 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值) 较 Lovo/EGFP 及 Lovo 空白细胞明显升高 ($P < 0.05$) (图 5)。

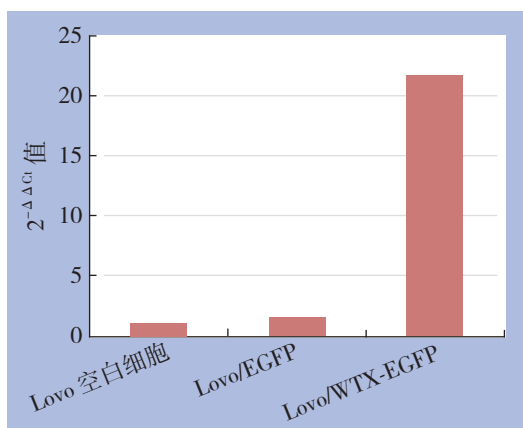


图 5 各组细胞 WTX mRNA 表达水平
Figure 5 WTX mRNA expression level of each group

2.5 转导细胞 WTX 蛋白表达水平

Western blot 结果显示 Lovo/WTX-EGFP 细胞 WTX 蛋白表达水平 (与内参 β -actin 灰度值) Lovo/EGFP 及 Lovo 空白细胞升高 ($P < 0.05$) (图 6)。

2.6 稳转细胞株 Lovo/WTX-EGFP 的建立

通过多次挑克隆培养富集带荧光的细胞成功建立了稳定转染的结肠癌细胞株 Lovo/WTX-EGFP。镜下可见大量荧光 (图 7)。

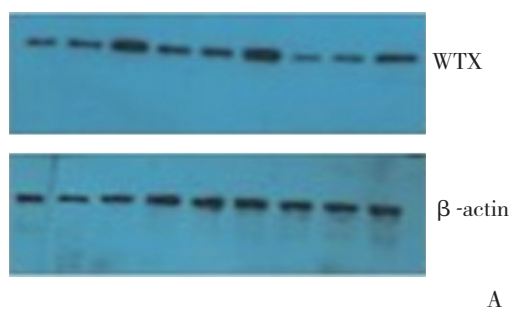
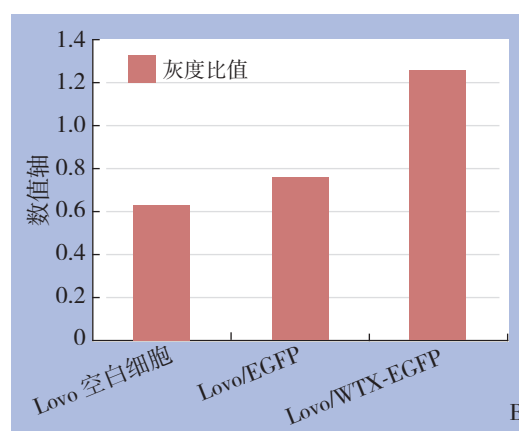


图 6 各组细胞 WTX 蛋白表达水平
Figure 6 WTX protein expression level of each group



A: Western blot 条带; B: 定量统计图
A: Western blot bands; B: Quantitative statistical histograms

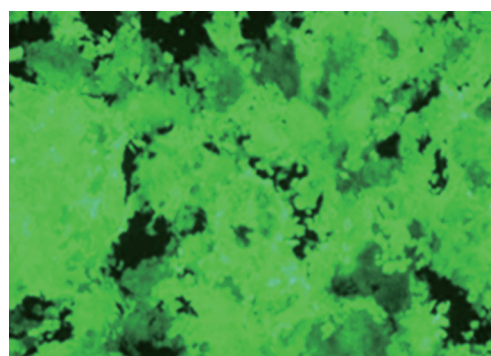
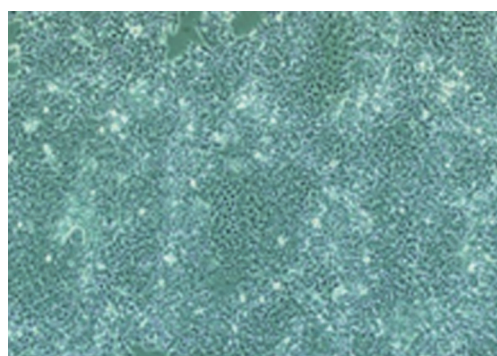


图 7 稳转细胞株 Lovo/WTX-EGFP 镜下观察 ($\times 100$)
Figure 7 Microscopic observation of the stable Lovo/WTX-EGFP cells ($\times 100$)

3 讨 论

大量研究表明, 一些经典信号通路如 Wnt/ β -catenin 信号通路也被证明与结肠癌密切相关。Wnt/ β -catenin 信号通路成分如 APC, Axin, β -catenin 等在多种人类肿瘤中突变, 其最终结果是 Wnt 通路激活及细胞增生的失控。肿瘤发生中 Wnt 通路的异常激活是以 β -catenin 的结构或

功能变化为中心的。已证实 90% 以上的结肠癌存在 Wnt 通路的激活及继发于此的 β -catenin 蛋白在细胞内的异常积聚, 从而引起其下游靶基因的异常激活, 诱发细胞癌变^[3]。

2007 年《Science》^[4]中报道了一种定位于 X 染色体的抑癌基因 WTX。由于其定位特殊, 位于 X 染色体上, 不遵循肿瘤发生的“二次打击”规律, 仅需一个刺激因素即“单次打击”便可使

其失活从而导致肿瘤发生, 与其他抑癌基因大不相同, 因此受到广泛关注。研究发现, WTX 蛋白能与 β -catenin, AXIN1, β -TrCP2, APC 等形成“ β -catenin 降解复合物”, 导致 β -catenin 降解, 从而负向调节 Wnt/ β -catenin 通路。转染 WTX 至 U2OS 骨肉瘤细胞系后可明显抑制细胞集落生长, 表明 WTX 具有抑癌基因特性^[1]。有学者^[5]认为 WTX 的发现对之前的经典理论是一个意外的革命。

目前对 WTX 的研究主要集中在肾母细胞瘤的基因突变方面, 突变率约占 Wilms 瘤总数的 1/3^[6]。但在白血病、肝细胞癌、胃癌、结直肠癌及硬化性骨发育不良等其他肿瘤中突变非常少见^[7-12]。本课题组前期研究发现, WTX 在结肠癌组织中的 mRNA 及蛋白水平均低于癌旁组织和远癌组织; 提示抑癌基因 WTX 可能在结肠癌的发生发展进程中起到重要作用^[2]。构建合适 WTX 载体, 建立稳定转导 WTX 的结肠癌细胞株是进一步研究 WTX 基因功能及其在结肠癌中表达降低机制的重要基础。

慢病毒载体 (lentiviral vector) 是以慢病毒基因组为基础, 去除部分基因并代之以所需的目的基因和标记物构建而成, 具有可携带较大外源基因、感染效率高、可稳定整合入宿主细胞基因组、有包装后更安全并可感染非分裂期细胞等优点^[13]。目前慢病毒载体已成为肿瘤基因治疗的热点。WTX 基因全长 8 443 bp, 编码区 3 408 bp。直接应用 WTX 质粒进行细胞转导预计转导效率低下, 且质粒仅可瞬时转染, 无法建立稳定转导 WTX 的细胞株; 其他载体如腺病毒载体转导效率虽较高, 但目的基因无法整合至宿主细胞基因组, 仅能短暂表达, 亦无法建立稳定转导细胞株。故构建 WTX 慢病毒载体是理想的选择。

本研究通过目前较为先进的 Gateway 技术成功建立了包含 EGFP 的 WTX 慢病毒载体 PLV. Ex3d.null-EF1A>WTX>IRES/EGFP, 并经筛选鉴定完全正确; 经慢病毒包装后成功转导结肠癌 Lovo 细胞, 经 qPCR 及 Western blot 检测 WTX 表达水平较未转细胞明显升高; 并通过多次挑克隆培养建立了稳定转导 WTX 的 Lovo/WTX-EGFP 细胞株, 为体内外研究 WTX 在结肠癌中的作用机制提供了良好的实验基础。

参考文献

- [1] Rivera MN, Kim WJ, Wells J, et al. An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor[J]. *Science*, 2007, 315(5812):642-645.
- [2] 李思齐, 张毅, 梁道明, 等. 抑癌基因 WTX 在结肠癌中的表达及其意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(10):1217-1221.
- [3] Kuphal F, Behrens J. E-cadherin modulates Wnt-dependent transcription in colorectal cancer cells but does not alter Wnt-independent gene expression in fibroblasts[J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(4):457-467.
- [4] Major MB, Camp ND, Berndt JD, et al. Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling[J]. *Science*, 2007, 316(5827):1043-1046.
- [5] Huff V. Wilms tumor genetics: a new, UnX-pected twist to the story[J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(2):105-107.
- [6] Ruteshouser EC, Robinson SM, Huff V. Wilms tumor genetics: mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2008, 47(6):461-470.
- [7] Scheel SK, Porezner M, Pfeiffer S, et al. Mutations in the WTX-gene are found in some high-grade microsatellite instable (MSI-H) colorectal cancers[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10:413.
- [8] Yoo NJ, Kim S, Lee SH. Mutational analysis of WTX Gene in Wnt/ β -catenin pathway in gastric, colorectal, and hepatocellular carcinomas[J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54(5):1011-1014.
- [9] Chung NG, Kim MS, Chung YJ, et al. Tumor suppressor WTX gene mutation is rare in acute leukemias[J]. *Leuk Lymphoma*, 2008, 49(8):1616-1617.
- [10] Jenkins ZA, van Kogelenberg M, Morgan T, et al. Germline mutations in WTX cause a sclerosing skeletal dysplasia but do not predispose to tumorigenesis[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(1):95-100.
- [11] Perdu B, de Freitas F, Frints SG, et al. Osteopathia striata with cranial sclerosis owing to WTX gene defect[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(1):82-90.
- [12] Barbosa M, Perdu B, Senra V, et al. Osteopathia striata with cranial sclerosis[J]. *Acta Med Port*, 2010, 23(6):1147-1150.
- [13] Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors[J]. *Mol Biotechnol*, 2007, 36 (3):184-204.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 李思齐, 张毅, 何绍焯, 等. [J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(2):159-164. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.02.007

Cite this article as: LI SQ, ZHANG Y, HE SX, et al. Establishment of WTX-containing lentiviral vector and its stably transduced colon cancer cell line Lovo/WTX-EGFP[J]. *Chin J Gen Surg*, 2013, 22(2):159-164. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.02.007